

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.  
13. Jg. 1975, S. 123–128

## Optimierte Bestimmung und Eigenschaften der NADPH-abhängigen Glutathion-Reduktase im Serum

### *Untersuchungen über die Glutathion-Reduktase im Serum, I. Mitteilung*

Von G. Weidemann

Aus dem Chemischen Institut (Vorstand: Prof. Dr. G. Hillmann) der Städtischen Krankenanstalten Nürnberg

(Eingegangen am 22. November 1974/5. Februar 1975)

Für die Bestimmung der bisher nicht systematisch untersuchten Glutathion-Reduktase (EC 1.6.4.2) im Serum wurden die Reaktionsbedingungen optimiert. Imidazol erweist sich als die am besten geeignete Puffersubstanz, da mit Imidazol/HCl-Puffer stets die höchste Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum gemessen wurde und im Gegensatz zu allen anderen geprüften Pufferlösungen die maximale Enzymaktivität ohne Vorinkubation erreicht wurde. Die pH-Aktivitätskurve der Glutathion-Reduktase im Serum zeigt in Imidazol-Puffer ein breites pH-Optimum zwischen 6,5–6,9. Maximale Enzymaktivität und eine lineare Zeit-Umsatz-Kurve über 10 min bis 20 U/l Testlösung erhält man bei einer GSSG-Konzentration von 2 mmol/l und einer NADPH-Konzentration von 0,43 mmol/l Testansatz. Bei 100 klinisch gesunden Probanden wurde eine Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum zwischen 20–60 U/l gefunden. Im optimierten Bestimmungsansatz reagiert die Glutathion-Reduktase im Serum spezifisch mit GSSG und NADPH. Na-p-äthylmercuri-mercaptobenzolsulfonat, 1,3 µmol/l, N-Äthylmaleimid, 12 µmol/l, und  $Zn^{++}$ , 0,4 mmol/l Testansatz hemmen die Enzymaktivität um 50%. Bei 4 °C ist die Glutathion-Reduktase im Serum mindestens 20 Tage, bei –20 °C länger als 6 Monate ohne Aktivitätsverminderung haltbar. Nach Inkubation des Serums 60 min bei 56 °C findet man keine Abnahme der Glutathion-Reduktase-Aktivität. In Gegenwart von NADPH ist die Stabilität der Glutathion-Reduktase bereits bei 37 °C deutlich vermindert.

### *Optimized determination and properties of NADPH-dependent glutathione reductase in serum Studies on serum glutathione reductase, I.*

Reaction conditions were optimized for the determination of serum glutathione reductase, which has not yet been investigated systematically. Imidazole was found to be the most suitable buffer material; the highest glutathione reductase activity in serum was always obtained with imidazole/HCl buffer, which, in contrast to all other tested buffers, also resulted in the maximal enzyme activity without preincubation. In imidazole buffer, the pH-activity curve of serum glutathione reductase shows a broad optimum between pH 6.5 and 6.9. A GSSG concentration of 2 mmol/l and a NADPH concentration of 0.43 mmol/l gave maximal enzyme activity and a linear reaction over 10 min up to 20 U/l test solution. An investigation of serum glutathione reductase activity from 100 clinically healthy probands gave values between 20 and 50 U/l. In the optimized assay system the glutathione reductase in the serum reacts specifically with GSSG and NADPH.

1.3 µmol/l Na-p-ethylmercuri-mercapto-benzene-sulphonate, 12 µmol/l N-ethylmaleimide, and 0.4 mmol/l  $Zn^{++}$  in the assay system inhibit the enzyme by 50%. Glutathione reductase in serum can be stored without loss of activity for at least 20 days at 4 °C, and for longer than 6 months at –20 °C. There is no detectable decrease in the glutathione reductase activity after incubation of the serum for 60 min at 56 °C, whereas in the presence of NADPH the enzyme shows a marked decrease in activity even at 37 °C.

Die Glutathion-Reduktase (EC 1.6.4.2) katalysiert die NADPH- bzw. NADH-abhängige Reduktion von oxidiertem Glutathion (GSSG):



Das Enzym wurde in vielen Mikroorganismen sowie in zahlreichen pflanzlichen und tierischen Geweben nachgewiesen. Von den menschlichen Organen enthalten, auf Frischgewicht bezogen, Leber und Niere die höchste Glutathion-Reduktase-Aktivität (1). Während vor allem über die Glutathion-Reduktase der menschlichen Blutzellen, insbesondere der Erythrocyten, zahlreiche Publikationen vorliegen, ist die Glutathion-Reduktase im Serum bisher nur vereinzelt untersucht worden (1–6).

Die diagnostische Relevanz einer erhöhten bzw. erniedrigten Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum ist unbekannt.

Bei Untersuchungen über eine Störung der mit reduziertem Glutathion aktivierten Creatin-Kinase-Bestimmung durch Glutathion-Reduktase wurde in einem ausgewählten Kollektiv bei 2% der Patienten eine erhöhte Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum beobachtet (7). Es erschien danach sinnvoll, die diagnostische Bedeutung der Glutathion-Reduktase-Bestimmung im Serum eingehend zu prüfen.

Die in der Literatur mitgeteilten Reaktionsbedingungen für die Bestimmung der Glutathion-Reduktase gleicher und verschiedener Provenienz im optischen Test diffe-

rieren erheblich. Es wurden daher für die Messung der NADPH-abhängigen Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum die Reaktionsbedingungen bezüglich Wahl des Puffers, Pufferkonzentration, pH-Optimum, Substrat- und Cosubstratkonzentration sowie EDTA-Zusatz optimiert. Mit dem optimierten Bestimmungsansatz wurden dann orientierende Untersuchungen über Eigenschaften der Glutathion-Reduktase im Serum durchgeführt.

### Material und Methodik

Glutathion, oxydierte Form (GSSG), NADPH (15 502), NADH (15 297), Glutathion-Reduktase aus Hefe, Flavin-adenin-dinucleotid, Triäthanolamin-Hydrochlorid wurden von der Fa. Boehringer (Mannheim), N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-2-äthansulfonsäure p. A. (Hepes), N-Äthylmaleimid, Jodessigsäure, Na-salz von der Fa. Serva (Heidelberg) und Na-p-äthylmercuri-mercaptobenzolsulfonat (Thiocid) von der Fa. Asid (München) bezogen. Die übrigen Reagenzien, p. A. Qualität, waren Produkte der Firmen Merck (Darmstadt) und Schuchardt (München).

Die Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum wurde durch kontinuierliche Messung im Filterphotometer Eppendorf mit Küvettenwechselautomatik und Schreiber oder mit dem Enzymautomaten 5020, Fa. Eppendorf, bei 25 °C bestimmt. Zur Ermittlung des optimalen Puffers für die Bestimmung der Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum wurden Triäthanolamin-Hydrochlorid/NaOH-, Tris/Maleinat-, Phosphat-, Collidin/HCl-, Dimethylglutarsäure/NaOH-, Dimethylaminoäthylendiamin/HCl und Hepes-Puffer jeweils bei den pH-Werten 6,5, 6,7, 6,9, 7,1, 7,3, 7,5 und einer Pufferkonzentration von 50, 100, 150, 200 und 250 mmol/l Testansatz geprüft. Die Substrat- und Cosubstratkonzentration im Test betrugen 2 mmol/l GSSG und 0,43 mmol/l NADPH. EDTA wurde in einer Konzentration von 0,3 mmol/l zugesetzt. Start der Reaktion erfolgte mit GSSG-Lösung 5 min nach Zugabe des Serums zur Puffer-EDTA-Cosubstrat-Lösung. Es wurden 5 Seren mit normaler und 10 Seren mit erhöhter Glutathion-Reduktase-Aktivität untersucht.

### Ergebnisse und Diskussion

#### Ermittlung der optimierten Reaktionsbedingungen

##### Wahl des Puffers, pH-Optimum und Pufferkonzentration

Die Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum wurde bei den unter „Material und Methodik“ angegebenen Reaktionsbedingungen in den dort angegebenen Pufferlösungen gemessen.

In allen untersuchten Seren wurde die höchste Enzymaktivität in Imidazol/HCl-Puffer bei pH 6,5–6,9 und einer Pufferkonzentration von 200 mmol/l gemessen.

Die Verwendung von Imidazol-Puffer für Glutathion-Reduktase-Bestimmungen wurde noch nicht beschrieben. Die Messung der Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum erfolgte bisher ausschließlich in Phosphat-Puffer bei unterschiedlichen pH-Werten und Pufferkonzentrationen (Tab. 1).

Im Gegensatz zu Imidazol-Puffer wurde in sämtlichen anderen Pufferlösungen mit zunehmender Dauer der Vorinkubation bei fast allen Seren eine Zunahme der Glutathion-Reduktase-Aktivität gefunden. Nach dem Start mit GSSG verläuft die Reaktion unabhängig von der Dauer der Vorinkubation linear, d. h. in Gegenwart von GSSG erfolgt keine weitere Aktivitätszunahme.

Wie aus Abbildung 1 hervorgeht, ist die Aktivitätszunahme durch längere Vorinkubation pH-abhängig. Das Maximum der Glutathion-Reduktase-Aktivität wurde in den verschiedenen Seren nach unterschiedlich langer Vorinkubation, die z. T. länger als 60 min betrug, erreicht. In keinem Fall wurde die in Imidazol-Puffer nach 5 min gemessene Glutathion-Reduktase-Aktivität übertroffen. Für die Bestimmung der Glutathion-Reduktase-

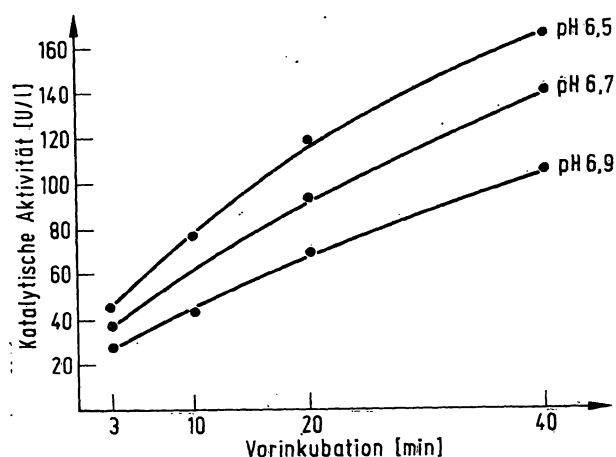


Abb. 1. pH-abhängige Zunahme der Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum nach 3–40 min Vorinkubation bei 25 °C in Phosphat-Puffer, 200 mmol/l. Übrige Meßbedingungen s. „Methodik“.

Tab. 1. Reaktionsbedingungen verschiedener Autoren zur Bestimmung der Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum.

Autor	Puffer	Pufferkonzentration im Test [mmol/l]	pH	Temperatur	Vorinkubation [min]	Start mit	GSSG-Konzentration im Test [mmol/l]	NADPH-Konzentration im Test [mmol/l]
Manso & Wroblewski (1)	Phosphat	115	7,6	Raumtemperatur (26 °C)	20	GSSG	2,2	0,30
Horn & Bruns (2)	Phosphat	35,7–53,6	6,5	25 °C	?	Serum	0,5	0,40
Kerppola et al. (3)	Phosphat	?	7,4	Raumtemperatur	?	?	3,5	0,96
West et al. (4)	Phosphat	8,6	7,5	37 °C	20	GSSG	11	0,67
Franken & Stork (5)	Phosphat	115	7,6	Raumtemperatur	20	GSSG	?	0,09
Kleine & Chlond (6)	Phosphat	86,6	6,5	25 °C	?	?	0,5	0,17

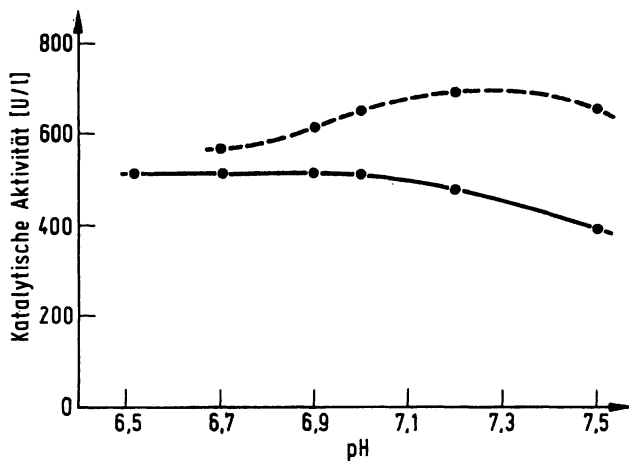


Abb. 2. Abhängigkeit der Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum und der Hefe-Glutathion-Reduktase-Aktivität vom pH-Wert des Imidazol-Puffers. Übrige Meßbedingungen: s. optimierter Bestimmungsansatz. Seren mit höherer und niedrigerer Glutathion-Reduktase-Aktivität ergeben einen analogen Kurvenverlauf. Glutathion-Reduktase im Serum: —, Hefe-Glutathion-Reduktase: - - -.

Aktivität im Serum erweist sich somit Imidazol als die am besten geeignete Puffersubstanz. Über die Ursache der Aktivitätszunahme der Glutathion-Reduktase während längerer Vorinkubation in den verschiedenen Pufferlösungen, mit Ausnahme von Imidazol-Puffer, wird an anderer Stelle berichtet.

In Imidazol/HCl-Puffer ergibt sich für die Bestimmung der Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum ein breites pH-Optimum bei pH 6,5–6,9 (Abb. 2). Für gereinigte Hefe-Glutathion-Reduktase liegt das pH-Optimum bei 7,2. Die optimale Imidazol-Konzentration beträgt 200 mmol/l Testansatz (Abb. 3).

#### Substrat- und Cosubstratkonzentration

Maximale Enzymaktivität und eine lineare Zeit-Umsatz-Kurve über 10 min bis 20 U/l Testlösung erhält man bei einer GSSG-Konzentration von 2 mmol/l und einer NADPH-Konzentration von 0,43 mmol/l Testansatz.

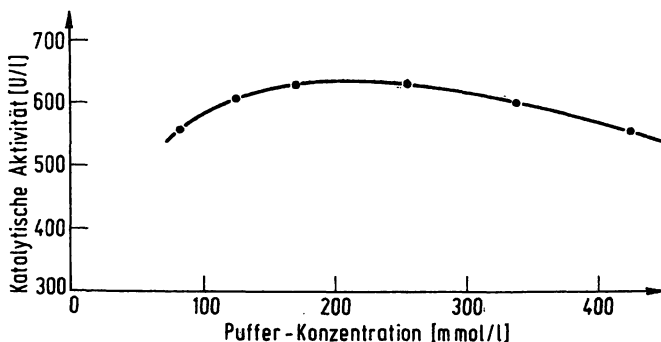


Abb. 3. Abhängigkeit der Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum von der Konzentration des Imidazol-Puffers. Übrige Meßbedingungen: s. optimierter Bestimmungsansatz.

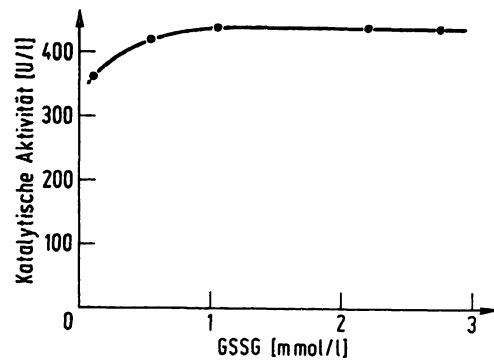


Abb. 4. Abhängigkeit der Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum von der GSSG-Konzentration. Übrige Meßbedingungen: s. optimierter Bestimmungsansatz.

Abbildung 4 zeigt, daß unter den angegebenen Reaktionsbedingungen die Enzymaktivität bei Substratsättigung gemessen wird. Bei zehnfacher Substratkonzentration und 0,43 mmol NADPH/l erhält man eine um etwa 10% niedrigere Enzymaktivität. Cosubstratkonzentrationen über 0,5 mmol/l ergeben eine initiale Hemmung der Glutathion-Reduktase-Aktivität, die durch GSSG-Erhöhung bis 20 mmol/l nicht aufgehoben wird.

#### EDTA-Zusatz

Durch Zugabe von EDTA zum Bestimmungsansatz wird eine Erhöhung der Glutathion-Reduktase-Aktivität um maximal 5% erreicht. In Imidazol-Puffer verläuft die Reaktion auch ohne EDTA-Zusatz linear.

#### Optimierter Bestimmungsansatz

Für die Bestimmung der Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum ergeben sich folgende optimierte Reaktionsbedingungen:

##### a) manuelle Methode

			Konzentration im Test
Imidazol/HCl-Puffer	pH 6,9	2,4 ml	200 mmol/l
EDTA-Lösung		0,1 ml	0,3 mmol/l
NADPH-Lösung		0,1 ml	0,43 mmol/l
Serum		0,1 ml	

5 min Inkubation bei 25 °C

Startreagenz:

GSSG-Lösung (pH etwa 6,9) 0,05 ml 2,0 mmol/l

Meßtemperatur: 25 °C

Meßstrahlung: 334 (340,366) nm

Schichtdicke: 1 cm

Konzentration der Enzymaktivität =  $4583 \cdot \Delta E_{334}/\text{min}$  [U/l]

##### b) Eppendorf-Enzymautomat 5020

Die Konzentrationen im Test und der pH-Wert der Lösungen entsprechen denen für die manuelle Methode.

## Analysenschema:

Reaktionsgemisch (Imidazol/HCl-Puffer, NADPH, EDTA)	500 $\mu$ l
Serum	20 $\mu$ l
Startreagenz (GSSG)	20 $\mu$ l

Vorinkubation: 5 min

Meßstrahlung: 334 nm

Faktor für Enzymrechner Eppendorf: 3750

## Präzision von Tag zu Tag

Bei Werten um 50 U/l beträgt die Standardabweichung bei manueller Bestimmung  $\pm 3$  U/l, VK = 6%, bei Bestimmung mit dem Enzymautomaten  $\pm 2$  U/l, VK = 4% (n = 25). Bei Seren mit erhöhter Glutathion-Reduktase-Aktivität erniedrigt sich der VK:

- manuelle Methode:  $\bar{x} = 365 \pm 12$  U/l, VK = 3,3% (n = 25)
- Enzymautomat:  $\bar{x} = 380 \pm 11$  U/l, VK = 2,9% (n = 25)

## Normalbereich

Vorläufiger Normalbereich, ermittelt an 100 klinisch gesunden Personen: 20–60 U/l. Eine Alters- oder Geschlechtsabhängigkeit des Normalbereiches wurde bisher nicht beobachtet.

## Einfluß der Hämolyse auf die Glutathion-Reduktase-Bestimmung im Serum

Da die Erythrocyten Glutathion-Reduktase enthalten, wurde der Einfluß der Hämolyse auf die Glutathion-Reduktase-Bestimmung im Serum untersucht. Wie die Abbildung 5 zeigt, wird pro 1 g Hämoglobin/l Plasma eine um etwa 10% zu hohe Glutathion-Reduktase-Aktivität gemessen.

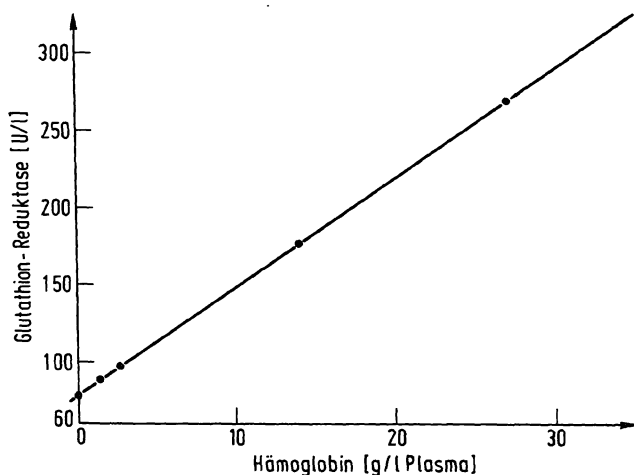


Abb. 5. Einfluß der Hämolyse auf die Bestimmung der Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum. Ein Teil einer EDTA-Blutprobe wurde durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen hämolysiert. Aus dem Hämolysat wurden mit dem Plasma des anderen Teiles Proben mit verschiedener Hämoglobin-Konzentration hergestellt.

## Eigenschaften der Glutathion-Reduktase im Serum

Spezifität, Isoenzyme und  $K_m$ -Werte

Im Vergleich zu GSSG beträgt die Umsatzgeschwindigkeit der Glutathion-Reduktase mit CoASSG etwa 10%, mit anderen symmetrischen und gemischten Disulfiden sowie Thiosulfateestern nur weniger als 1% (8). Erwartungsgemäß fanden wir in Seren mit erhöhter Glutathion-Reduktase-Aktivität bei Verwendung von Cystin, Cysteamin und Dithiodiglykolsäure als Substrat keine Enzymaktivität. Bei Ersatz von NADPH durch äquimolare Mengen NADH im optimierten Bestimmungsansatz betrug die Glutathion-Reduktase-Aktivität weniger als 2%.

$K_m$ -Werte der Glutathion-Reduktase im Serum wurden bisher nur von *Horn & Bruns* mitgeteilt (2). Sie erhielten für GSSG = 70  $\mu$ mol/l und für NADPH = 25  $\mu$ mol/l, gemessen in Phosphat-Puffer bei niedriger Pufferkonzentration.

*Staal & Veeger* (9) haben darauf hingewiesen, daß sich bei Bestimmung der  $K_m$ -Werte der Erythrocyten-Glutathion-Reduktase in Phosphat-Puffer bei verschiedener Pufferkonzentration unterschiedliche  $K_m$ -Werte ergeben. Die von diesen Autoren bei entsprechend niedriger Pufferkonzentration gemessenen Werte für Erythrocyten-Glutathion-Reduktase liegen mit  $K_m = 19$   $\mu$ mol/l für GSSG und  $K_m = 9,5$   $\mu$ mol/l für NADPH deutlich niedriger als die der Glutathion-Reduktase im Serum. Bei der Bestimmung der  $K_m$ -Werte der Glutathion-Reduktase im Serum für GSSG und NADPH ist zu berücksichtigen, daß im Serum regelmäßig zwei, in einigen Fällen auch drei NADPH-abhängige Glutathion-Reduktase-Fractionen elektrophoretisch nachweisbar sind (in Vorbereitung). Über die  $K_m$ -Werte der isolierten und gereinigten Isoenzyme der Glutathion-Reduktase im Serum sowie weitere enzymkinetische Untersuchungen wird gesondert berichtet.

## Aktivatoren und Inhibitoren

Wie in-vitro-Untersuchungen zeigten, wird die Glutathion-Reduktase-Aktivität der Erythrocyten, Leukozyten und Thrombocyten durch Flavin-adenin-dinucleotid (FAD) beeinflusst: während die Glutathion-Reduktase-Aktivität der Leukozyten und Thrombocyten bei Gesunden und Patienten mit einem Mangel an Erythrocyten-Glutathion-Reduktase gehemmt wird, wurde bei Enzymmangelträgern eine deutliche, bei Gesunden eine geringe Aktivierung der Erythrocyten-Glutathion-Reduktase durch FAD gefunden (10–13). Die Glutathion-Reduktase im Serum wird dagegen nach eigenen Untersuchungen durch FAD weder gehemmt noch aktiviert.

Durch die Wahl des Anions im Imidazol-Puffer wird die Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum beeinflusst (Tab. 2). Acetat-, Sulfat- und Phosphat-Ionen hemmen die NADPH-abhängige Enzymaktivität.

Tab. 2. Einfluß des Puffer-Anions auf die Aktivität der Glutathion-Reduktase im Serum. Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. Seren mit höherer und niedrigerer Aktivität ergeben analoge Resultate.

Pufferkation Imidazol		
Pufferanion	Enzymaktivität [U/l]	Enzymaktivität [%]
Chlorid	433,5	100
Bromid	437,4	100,9
Sulfat	397,6	91,7
Acetat	362,2	83,6
Phosphat	360,0	83,0

Tab. 3. Temperaturstabilität der Glutathion-Reduktase im Serum. Inkubation des Serums bei 56 °C 0–100 min und anschließende Bestimmung der Glutathion-Reduktase-Aktivität bei 25 °C. Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. Seren mit höherer und niedrigerer Aktivität ergeben analoge Resultate.

Inkubation bei 56 °C [min]	Enzymaktivität [U/l]
0	311,8
15	310,2
45	308,4
60	307,2
100	311,8

Im Bestimmungsansatz *ohne EDTA* wurde der Einfluß von Zn-Ionen, Jodessigsäure, N-Äthylmaleimid und einer organischen Hg-Verbindung auf die Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum geprüft. Durch Jodessigsäure, 75 µmol/l, wird die Enzymaktivität nicht verändert; Zn-Ionen, 0,4 mmol/l, und N-Äthylmaleimid, 12 µmol/l Testansatz, hemmen die Glutathion-Reduktase-Aktivität um 50%. Die Hemmung der Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum durch Thiocid zeigt Abbildung 6.

#### Haltbarkeit und Temperaturstabilität

Die Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum ist bei niedrigen Temperaturen lange haltbar. Bei –20 °C können die Proben länger als 6 Monate, bei 4 °C mindestens 20 Tage ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden. Im Gegensatz zu *Manso & Wroblewski* (1), die nach Inkubation des Serums bei 56 °C bereits nach 5 min eine Verminderung der Glutathion-Reduktase-Aktivität um 50% fanden, konnten wir auch nach 60 min noch keine Abnahme der Enzymaktivität nachweisen (Tab. 3).

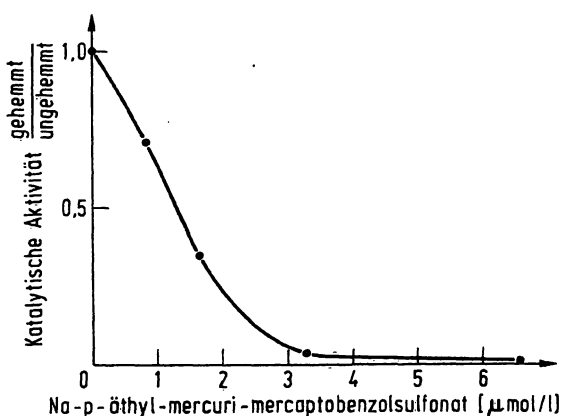


Abb. 6. Hemmung der Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum durch Na-p-äthyl-mercuri-mercaptobenzolsulfonat (Thiocid). Anstelle von EDTA-Lösung wurde dem Bestimmungsansatz 5 min vor dem Start der Reaktion mit GSSG das entsprechende Volumen Thiocid-Lösung zugesetzt.

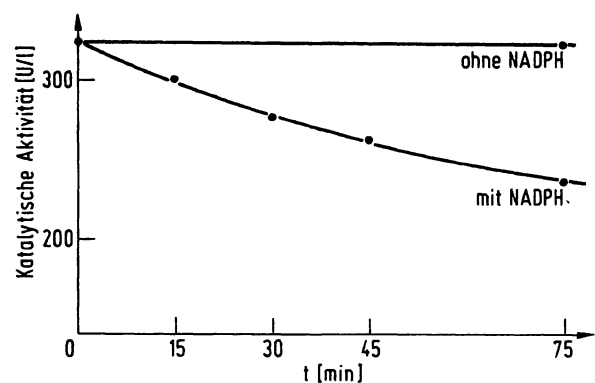


Abb. 7. Einfluß von NADPH auf die Stabilität der Glutathion-Reduktase-Aktivität im Serum bei 37 °C. Inkubation des Serums im Bestimmungsansatz mit und ohne NADPH 0–75 min bei 37 °C. Anschließend Messung der Glutathion-Reduktase-Aktivität bei 25 °C.

Über eine rasche Inaktivierung der NADPH- und NADH-abhängigen Erythrocyten-Glutathion-Reduktase bei 62 °C und 76 °C in Gegenwart der reduzierten Cosubstrate wurde von *Icen* (14) berichtet. Nach eigenen Untersuchungen zeigt die Glutathion-Reduktase im Serum im Bestimmungsansatz mit NADPH bereits bei 37 °C eine verminderte Stabilität: Während nach 75 min Vorinkubation des Serums im Bestimmungsansatz ohne NADPH keine Abnahme der Glutathion-Reduktase-Aktivität gefunden wurde, tritt mit NADPH im Ansatz eine deutliche Inaktivierung auf (Abb. 7). Inkubation bei 56 °C ergibt in Anwesenheit von NADPH nach 30 min vollständigen Aktivitätsverlust, in Abwesenheit von NADPH dagegen keine Aktivitätsabnahme. Die Inaktivierung der Glutathion-Reduktase durch NADPH ist nicht ausschließlich auf das reduzierte Cosubstrat zurückzuführen. Es fand sich nämlich keine Abnahme der Enzymaktivität in Gegenwart von NADPH, wenn Serum mit wäsr. NADPH-Lösung im Verhältnis 1 + 1 60 min bei 56 °C inkubiert wurde. Die noch eingehend zu prüfende inaktivierende Wirkung des reduzierten Cosubstrates ist wahrscheinlich von der Ionenkonzentration der Inkubationslösung abhängig.

## Literatur

1. Manso, C. & Wroblewski, F. (1958), *J. Clin. Invest.* 37, 214–218.
2. Horn, H.-D. & Bruns, F. H. (1958), *Biochem. Z.* 331, 58–64.
3. Kerppola, W., Nikkila, E. A. & Pitkänen, E. (1959), *Acta Med. Scand.* 164, 357–365.
4. West, M., Berger, C., Romy, H. & Zimmermann, H. J. (1961), *J. Lab. Clin. Med.* 57, 946–954.
5. Franken, F. H. & Stork, W. (1962), *Med. Welt*, 589–595.
6. Kleine, T. O. & Chlond, H. (1966), *Clin. Chim. Acta* 13, 407–411.
7. Weidemann, G. (1973), *diese Z.* 11, 134–135.
8. Mannervik, B. & Erikson, St. A. (1974), in *Glutathione* (Flohe, L., Benöhr, H. Ch., Sies, H. & Waller, H. D., Hrsg.) 1. Aufl. S. 120–131, Thieme Verlag, Stuttgart.
9. Staal, G. E. J. & Veeger, C. (1969), *Biochim. Biophys. Acta* 185, 49–62.
10. Staal, G. E. J., Helleman, P. W., Milligen-Boersma, P. W. & Verloop, M. C. (1968), *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 112, 1008–1009.
11. Beutler, E. (1969), *J. Clin. Invest.* 48, 1957–1966.
12. Glatzle, D., Weber, F. & Wiss, O. (1968), *Experientia* 24, 1122.
13. Benöhr, H. Ch. & Waller, H. D. (1974), in *Glutathione* (Flohe, L., Benöhr, H. Ch., Sies, H. & Waller, H. D., Hrsg.) 1. Aufl. S. 184–191, Thieme Verlag Stuttgart.
14. Icen, A., (1967), *Scand. J. Clin. Lab. Invest., Suppl.* 96, 1–67.

Dr. G. Weidemann  
Städt. Krankenanstalten  
85 Nürnberg 5  
Postfach